

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 235 528
A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 87100725.8

(51) Int. Cl. 4: **C11C 3/00**

(22) Anmeldetag: 20.01.87

(30) Priorität: 01.03.86 DE 3606735

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
09.09.87 Patentblatt 87/37

(64) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH FR IT LI NL

(71) Anmelder: **Dr. J. Hänsler GmbH**
Nordring 8
D-7557 Iffezheim(DE)

(72) Erfinder: **Washüttl, Josef, Prof. Dr. Dr.,**
Dipl.-Ing.
Gnedgasse 14-16
A-1130 Wien(AT)
Erfinder: **Viebahn, Renate, Dr. rer. nat.,**
Dipl.-Chem.
Nordring 10
D-7557 Iffezheim(DE)

(74) Vertreter: **Huss, Carl-Hans, Dipl.-Ing.**
Patentanwalt Griesstrasse 3 a Postfach 14 54
D-8100 Garmisch-Partenkirchen(DE)

(54) Verfahren zur Herstellung von stabilen ozonisierten Ölen aus ungesättigten Pflanzenölen.

(57) Es wird ein Verfahren zur Herstellung von stabilen ozonisierten Ölen aus ungesättigten Pflanzenölen durch Einleiten eines Ozon-Sauerstoff-Gemisches in das Öl bis zur Sättigung beschrieben. Nach der Ozonisierung wird eine Extraktionsbehandlung in saurem Milieu in Gegenwart eines Redoxsystems, das zu einer gemäßigten radikalischen Reaktion fähig ist und in Gegenwart eines künstlichen oder natürlichen Antioxidationsmittels oder Reduktionsmittels durchgeführt.

EP 0 235 528 A1

Verfahren zur Herstellung von stabilen ozonisierten Ölen aus ungesättigten Pflanzenölen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von stabilen ozonisierten Ölen aus ungesättigten Pflanzenölen unter Entfernung von physiologisch bedenklichen niedermolekularen Aldehyden und Ketonen. Das erfindungsgemäße Verfahren liefert wertvolle Produkte, die sich zur therapeutischen und kosmetischen Anwendung bei Mensch und Tier eignen.

- 5 Die keimtötende Wirkung von ozonisiertem Olivenöl ist seit längerer Zeit bekannt (vgl. beispielsweise G. Cronheim, Journal of the American Pharmaceutical Association, Bd. 36 (1947), S. 274). Entsprechende Handelsprodukte wurden jedoch wegen ihrer leichten Zersetzbarkeit bald wieder aus dem Handel gezogen - (vgl. M. Schönbauer, OzoNachrichten, Bd. 3 (1984), S. 28).

- Bei der Umsetzung von Ozon mit ungesättigten Fettsäuren entstehen als therapeutisch wertvolle 10 Wirkstoffe peroxidische Produkte und als unerwünschte Nebenprodukte niedermolekulare Aldehyde und Ketone, insbesondere Malondialdehyd.

- Die peroxidischen Produkte werden aufgrund ihrer keimtötenden Wirkung gegenüber Bakterien, Pilzen und Hefen beispielsweise in der Dermatologie bei Pilzerkrankungen, Ulcus cruris, schlecht heilenden Wunden, infizierten Wunden und dergleichen eingesetzt. Demgegenüber sind die als Nebenprodukte 15 gebildeten Ketone und Aldehyde therapeutisch ohne Wirkung und größtenteils physiologisch bedenklich. Letzteres trifft insbesondere für Malondialdehyd zu, der bei vollständiger Ozonisierung von ungesättigten Pflanzenölen in nicht unbeträchtlichen Mengen auftritt (vgl. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, U.S. Department of Health and Human Services, 1984).

- Aufgabe der Erfindung ist es, ozonisierte Produkte aus ungesättigten Pflanzenölen bereitzustellen, die 20 therapeutisch wertvolle Produkte darstellen, über lange Zeit hinweg stabil sind und einen möglichst geringen Gehalt an niedermolekularen Aldehyden und Ketonen, insbesondere Malondialdehyd, aufweisen.

- Im Verlauf von Untersuchungen, die zur Lösung dieser Aufgabe angestellt wurden, wurde festgestellt, daß sich Malondialdehyd aus Produkten, die durch Einleiten eines Ozon-Sauerstoff-Gemisches bis zur Sättigung des Produkts erhalten worden sind, leicht zu weit über 50 Prozent mit Wasser extrahieren läßt. 25 Dieses Verfahren ist jedoch nicht praktikabel, da dabei die therapeutisch nutzbaren Peroxide zu etwa 90 Prozent zerfallen. Erfindungsgemäß wurde ein spezielles Extraktionsverfahren aufgefunden, das eine weitgehende Entfernung von Malondialdehyd ermöglicht, ohne daß es zu einer erheblichen Verminderung der Peroxidzahl, die ein Maß für den Gehalt an peroxidischen Produkten und somit für die Güte des Produkts darstellt, kommt.

- Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von stabilen ozonisierten Ölen aus ungesättigten Pflanzenölen durch Einleiten eines Ozon-Sauerstoff-Gemisches in das Öl bis zur Sättigung, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man nach der Ozonisierung eine Extraktionsbehandlung in saurem Milieu in Gegenwart eines Redoxsystems, vorzugsweise eines biologischen Redoxsystems, das zu einer 30 gemäßigten radikalischen Reaktion fähig ist und in Gegenwart eines künstlichen oder natürlichen Antioxidationsmittels oder Reduktionsmittels durchführt. Als ungesättigte Pflanzenöle kommen beispielsweise Olivenöl, Distelöl, Weizenkeimöl, Leinöl, Mandelöl, Nußöl, Sonnenblumenöl, Mohnöl, Sesamöl, Rizinusöl, Krotöl, Sojaöl und Palmöl in Frage. Oliven- und Distelöl werden bevorzugt. Ganz besonders bevorzugt wird Olivenöl.

- Das verwendete Redoxsystem, das zu radikalischen Reaktionen fähig ist, wirkt im Organismus sowohl 40 als Elektronenakzeptor als auch als Elektronendonator. Bevorzugte Beispiele für Redoxsysteme sind Ascorbinsäure, das im wesentlichen membranassoziierte Redoxsystem Vitamin E, Vitamin A und die biologischen chinoiden/benzoiden-Systeme. Besonders bevorzugt wird Ascorbinsäure.

- Zur Durchführung der Extraktionsbehandlung hat sich ein pH-Wert von 3,5 bis 6,5 als besonders geeignet erwiesen. Zur Gewährleistung dieses pH-Bereichs können beispielsweise Ascorbinsäure oder 45 Citronensäure eingesetzt werden.

Bevorzugte Beispiele für Antioxidationsmittel bzw. Reduktionsmittel sind Butylhydroxyanisol, Gallat und Hydrogensulfit.

Nachstehend wird die Erfindung unter Bezugnahme auf Olivenöl näher erläutert. Entsprechende Ausführungen gelten auch für die Verwendung von Distelöl und anderen ungesättigten Pflanzenölen.

- 50 Es wird reines Olivenöl entsprechend DAB 8 verwendet. Die Herstellung des Ozon-Sauerstoff-Gemisches erfolgt dabei unter Beachtung der Vorschriften zur Herstellung oder Abfüllung von medizinischem Sauerstoff. Das Ozon wird durch stille elektrische Entladung (absolut stickstofffrei, um die Bildung von aggressiven und reaktionsfähigen Stickoxiden, insbesondere Radikalen, zu vermeiden) gebildet. Bei der Ozonisierung des Öls wird mit einem kontinuierlichen Durchlauf mit einem Gasfluß im Bereich von 1 bis 2 Liter pro Minute gearbeitet. Die verwendete Ozon-Konzentration liegt vorzugsweise im Bereich von 50 bis

70 µg pro ml. Die Durchperlung des Öls erfolgt unter Verwendung eines zylindrischen Gefäßes mit möglichst hoher "Wassersäule" unter Thermostatisierung bei ca. 20°C. Dabei ist ein kontinuierlicher Durchfluß, insbesondere kurz vor der Sättigungsgrenze, die sich durch Festwerden des Produkts bei 20°C bemerkbar macht, wichtig. Für 12 Liter bei einer Gesamthöhe des zylindrischen Gefäßes von 60 cm und einem Durchmesser von ca. 20 cm ist eine gleichmäßige Durchperlungszeit von 180 bis 300 Stunden je nach Ozonkonzentration des Ozon-Sauerstoff-Ausgangsgemisches erforderlich.

Zur Extraktionsbehandlung werden pro 1 g ozonisiertes Öl etwa 2 bis 20, insbesondere 3 bis 10 und vorzugsweise etwa 5 ml wässrige Extraktionslösung verwendet. Die Extraktion erfolgt vorzugsweise durch eine 10-bis 60-minütige Ausschüttelung. Zur Steigerung der Effektivität kann der Ausschüttelvorgang mehrfach durchgeführt werden. Im Extrakt eventuell noch vorhandenes überschüssiges Sulfit kann durch Ausschütteln der öligen Phase mit 2-prozentiger wässriger Ascorbinsäurelösung entfernt werden.

Maßgebend für die Qualität des Produkts sind insbesondere die Peroxidzahl, bestimmt gemäß Sully - (DGF-Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten und verwandten Stoffen, Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft, Münster/Westfalen, 1950, S. 76) und der Gehalt an Malondialdehyd - (bestimmt gemäß H. Scherz et al., Mikrochem. Acta, Heft 5, 1967).

Besonders bevorzugte Kombinationen für die erfindungsgemäße Extraktionsbehandlung sind Ascorbinsäure + Butylhydroxyanisol, Citronensäure und Butylhydroxyanisol sowie Ascorbinsäure und Hydrogensulfit.

Nachstehend wird die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert.

Bestimmung von Malondialdehyd

Die Bestimmung beruht auf der Reaktion von Malondialdehyd mit 2-Methylindol in alkoholisch-salzsaurer Lösung zu einem beständigen, intensiv gefärbten Komplex.

Reagentien und Standardlösungen:

0.1 g 2-Methylenindol in 100 ml reinem EtOH gelöst; kurz vor der Verwendung 25 ml konz. HCl zugesetzt.

Eichreihe: 45.86 mg Malondialdehydtetraäthylacetal werden mit 3 ml konz. HCl versetzt und 3 min auf 50°C erwärmt. Danach wird mit destilliertem H₂O auf 500 ml ergänzt. 100, 200, 300, 400 und 500 µl dieser Lösung werden auf 1 ml aufgefüllt und mit 2 ml 2-Methylindollösung versetzt. Gleichzeitig wird ein Blindwert bestimmt, wobei 1 ml destilliertes H₂O mit 2 ml Reagenslösung versetzt wird. Nach 20 min wird die Extinktion bei 555 nm gemessen.

Bestimmungen von Malondialdehyd im ozonisierten Öl: Etwa 1 g des festen Öls wird genau eingewogen und unter N₂-Atmosphäre zur Verflüssigung etwas erwärmt (ca. 30°C). Da das Öl mit den Reagentien nicht mischbar ist, werden außer 2 ml Methylindol noch 1 ml destilliertes H₂O zugesetzt und während der 20 min Reaktionszeit unter N₂-Atmosphäre mit einem Magnetrührer gerührt, um eine vollständige Reaktion des Malondialdehyds zu ermöglichen. Gemessen wird dann die alkoholische Phase (nach dem Absetzen des Fettes) im Vergleich mit der jedes Mal parallel angesetzten Eichreihe.

Bestimmung der Peroxidzahl

In einem trockenen, entfetteten Kolben mit aufgesetztem Kühler werden 10 ml Eisessig und 10 ml Chloroform zur Entlüftung der Mischung 2 min unter Rückfluß erhitzt, danach 1 kg KJ in 1,3 ml H₂O (frisch zubereitet) zugegeben, ohne das Sieden zu unterbrechen, und nach weiteren 2 min etwa 1 g Öl (genau eingewogen) zugesetzt. Nach 4 min werden 50 ml destilliertes H₂O zugegeben und auf Zimmertemperatur abgekühlt.

Nach Zugabe von 1 ml 1-prozentiger Stärkelösung werden unter Umschwenken mit 0,1 n Natriumsulfatlösung bis zur Farblosigkeit der wässrigen Schicht titriert.

Berechnung:

$$\text{Peroxidzahl POZ} = \frac{a \cdot 0,1 \cdot 1000}{E}$$

a ... verbrauchte ml Thiosulfatlösung

5 E ... Einwaage in g

Beispiel 1

10 12 Liter Olivenöl (gemäß DAB 8) werden in ein zylindrisches Gefäß von ca. 20 cm Durchmesser gegeben. Die Füllhöhe beträgt ca. 60 cm. Das Gefäß wird auf 20°C thermostatisiert. Durch das Gefäß wird 240 Stunden lang gleichmäßig ein Ozon-Sauerstoff-Gemisch mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 1 bis 2 Liter/min durchgeperlt. Dieses Ozon-Sauerstoff-Gemisch ist durch stille elektrische Entladung von reinem, stickstofffreiem Sauerstoff hergestellt worden. Seine Ozon-Konzentration beträgt ca. 60 µg/ml.

15 Das erhaltene Produkt weist eine Peroxidzahl (POZ) von 929 und einen Malondialdehyd-Gehalt von 445 µg/g Öl auf.

100 g des ozonisierten Öls werden unter Stickstoffatmosphäre unter Rühren auf 30 °C bis zur Verflüssigung langsam entfernt und mit 500 ml einer 2-prozentigen Ascorbinsäurelösung in Gegenwart von 5 ml 38-prozentiger NaHSO₃-Lösung versetzt. Nach 15-minütigem Ausschütteln werden die Phasen getrennt und die ölige Phase erneut mit 300 ml einer 2-prozentigen Ascorbinsäurelösung ausgeschüttelt, um das überschüssige Sulfid vollständig zu entfernen. Bei erneuter Peroxidzahlbestimmung des Produkts ergibt sich ein Wert von 876. Im wässrigen Extrakt ergibt sich eine POZ von 0. Das ölige Produkt enthält Malondialdehyd in einer Menge von 68 µg/g Öl und der wässrige Extrakt 424 µg/g Extraktionsmittel.

25 Dies bedeutet, daß durch die Extraktionsbehandlung der Malondialdehyd zu 85 Prozent entfernt worden ist, während sich die Peroxidzahl nur um 5,7 Prozent verringerte. Der wässrige Extrakt enthält, wie gewünscht, keine Peroxide, während der Malondialdehyd fast vollständig in die wässrige Phase übergegangen ist.

Beispiel 2

30 Proben des gemäß Beispiel 1 hergestellten ozonisierten Olivenöls werden unterschiedlichen Extraktionsbehandlungen unterworfen. Hierzu wird jeweils 1 g ozonisiertes Öl mit verschiedenen wässrigen Lösungen 15 Minuten lang ausgeschüttelt. Anschließend werden POZ und Malondialdehydgehalt ermittelt. Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle zusammengestellt.

35

40

45

50

55

TABELLE

5	wässrige Extraktions- lösung	POZ		Malondialdehyd (µg/g)	
		Öl	Extrakt	Öl	Extrakt
10	ohne Extraktion	929	x)1	445	x)1
	+ 10 ml dest. H ₂ O	113	15	176	280
15	+ 3 ml dest. H ₂ O/EtOH 1:1	103	16	x)1	x)1
20	+ 3 ml Ascorbinsäure- lösung (1 g/100 ml H ₂ O)	413	0	91	310
	+ 10 ml Ascorbinsäure- lösung (1 g/100 ml H ₂ O)	425	0	146	633
25	+ 10 ml Ascorbinsäure- lösung (1 g/100 ml) + BHA	864	0	210	530
30	+ 10 ml Ascorbinsäure- lösung (1 g/100 ml) + Gallat	740	0	145	625
35	+ 10 ml Citronensäure- lösung (1 g/100 ml) + BHA ^X	799	18	215	640
40	+ 10 ml Citronensäure- lösung (1 g/100 ml) + Gallat	704	16	190	700
	+ 10 ml dest. H ₂ O + 100 µl NaHSO ₃ 38%ig	63	0	x)1	x)1
45	+ 10 ml dest. H ₂ O + 50 µl NaHSO ₃ 38%ig	87	0	x)1	x)1
50	+ 10 ml Ascorbinsäure- lösung (2 g/100 ml) + 100 µl NaHSO ₃ 38%ig x)2	649	0	47	306
55	+ 10 ml Ascorbinsäure- lösung (2 g/100 ml) + 50 µl NaHSO ₃ 38%ig x)2	876	0	68	424

Sämtliche hier angeführten Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen.

x)1 bedeutet, daß der betreffende Parameter nicht bestimmt wurde.

x)2 überschüssiges Sulfit wurde durch einmaliges Ausschütteln des Öls mit 10 ml H₂O (2 g Ascorbinsäure/100 ml) vollständig entfernt, wobei sich POZ und Malondialdehydgehalt des ozonisierten Öls nicht wesentlich veränderten: die Peroxidzahl sank von 876 auf 860, der Malondialdehydgehalt von 68 µg/g auf 52 µg/g.

X Butylhydroxyanisol

Besonders günstige Ergebnisse werden demnach durch Kombination von Ascorbinsäure und Butylhydroxyanisol, Citronensäure und Butylhydroxyanisol sowie Ascorbinsäure und Hydrogensulfit erhalten.

10

Beispiel für ozonisiertes Distelöl

	POZ		Malondialdehyd (µg/g)	
	Öl	Extrakt	Öl	Extrakt
ohne Extraktion	2315	-	704	-
wässrige Extraktion				
+ 10 ml Ascorbinsäure- lösung (2 g/100 ml)				
+ 50 µl NaHSO ₃ 38%ig	2119	-	62	621.

Ansprüche

30

1. Verfahren zur Herstellung von stabilen ozonisierten Ölen aus ungesättigten Pflanzenölen durch Einleiten eines Ozon-Sauerstoff-Gemisches in das Öl bis zur Sättigung, dadurch **gekennzeichnet**, daß man nach der Ozonisierung eine Extraktionsbehandlung in saurem Milieu in Gegenwart eines Redoxsystems, das zu einer radikalischen Reaktion fähig ist und in Gegenwart eines künstlichen oder natürlichen Antioxidationsmittels oder Reduktionsmittels durchführt.

35

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß man als ungesättigtes pflanzliches Öl Olivenöl, Distelöl, Weizenkeimöl, Leinöl, Mandelöl, Nußöl, Sonnenblumenöl, Mohnöl, Sesamöl, Rizinusöl, Krotonöl, Sojaöl oder Palmöl verwendet.

40

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch **gekennzeichnet**, daß man als Redoxsystem Ascorbinsäure, Vitamin A, Vitamin E oder chinoide/benzoide Systeme verwendet.

4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß man die Extraktion bei einem pH-Wert von 3,5 bis 6,5 durchführt.

5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß man zur Gewährleistung des sauren Milieus Ascorbinsäure oder Citronensäure verwendet.

45

6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß man als Antioxidationsmittel Butylhydroxyanisol oder Gallat bzw. biologische Antioxidantien verwendet.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch **gekennzeichnet**, daß man als Reduktionsmittel Hydrogensulfit verwendet.

50

55



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 87 10 0725

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
A	US-A-2 083 572 (J. McKEE et al.) * Patentansprüche 1,6; Seite 3, Spalte 1, Zeilen 16-54 *	1,2	C 11 C 3/00
A	--- DE-B-1 068 251 (CHEMISCHE FABRIK STOCKHAUSEN) * Patentansprüche 1,2 * -----	1,7	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)
			C 11 C A 61 K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 10-06-1987	Prüfer PEETERS J.C.
<div><div>EPA Form 1503 UJ B2</div><div><div>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</div><div>X von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A technologischer Hintergrund O nichtschriftliche Offenbarung P Zwischenliteratur T der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</div></div><div><div>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</div></div></div>			

THIS PAGE BLANK (USPTO)